

重症胰腺炎肺损伤大鼠磷脂酰肌醇-3 激酶表达及其抑制剂对肿瘤坏死因子- α 表达的影响

魏明 刘佳 涂玲 梁颖红 龚艳杰 张宜花

急性肺损伤 (ALI) 是重症急性胰腺炎 (SAP) 常见且严重的并发症之一, 若不及时干预将进一步发展成急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)^[1]。目前研究结果显示 ALI 是一种介质病, 中性粒细胞的活化、浸润及大量炎症介质的释放, 可造成肺组织及其毛细血管的损伤, 从而使肺损伤加重^[2-4]。已有研究显示磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/PKB) 通路在中性粒细胞的活化过程中起重要作用^[5-6], 而沃特曼青霉素 (Wortmannin) 是 PI3K 的抑制剂, 关于它能否减轻 SAP 时肺组织的损伤, 目前报道尚少。我们通过建立大鼠 SAP-ALI 模型, 观察 SAP 时 PI3K/PKB 通路活性变化, 并应用 Wortmannin 来阻断该通路之后观察肺损伤的变化, 探讨 Wortmannin 能否对 SAP 时肺组织损伤起到保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组与 SAP-ALI 模型的建立

健康成年雄性 SD 大鼠 70 只 (购自郑州大学实验动物中心), 体质量 320 ~ 360 g, 随机 (随机数字法) 分成假手术 (SO) 组 ($n = 10$)、SAP 组 ($n = 30$)、SAP + Wortmannin (SAP + W) 组 ($n = 30$); SAP 组与 SAP + W 组再分为 3、6、12 h 3 个亚组, 每组各 10 只。大鼠术前 12 h 禁食, 自由饮水, 常规麻醉消毒铺巾, 经上腹正中切口进腹, 采用外径 0.75 mm BD 针于十二指肠外侧壁戳入肠管内, 拔出针心, 沿乳头方向探入胆胰管 1.0 ~ 1.5 cm, 以 0.2 mL/min 的速度向胆胰管内匀速注入 4% 牛磺胆酸钠 (0.1 mL/100 g, 购自 Sigma 公司) 构建模型。SAP + W 组于造模前 2 h 腹腔注射 Wortmannin 1.4 mg/kg, SAP 组与 SO 组均于造模前用同样方法给予等量对应溶剂 (生理盐水)。SO 组除开腹后仅翻动肠管外, 其余操作同 SAP 组。SAP 组、SAP + W 组术后 3、6、12 h 活杀取材, SO 组于 12 h 活杀取材。

1.2 大鼠肺含水率检测及病理学观察

取右下肺叶, 滤纸吸干表面渗液及血迹, 称湿质量后,

置于 80 °C 的烤箱中烘烤 48 h 至恒重, 称干质量, 计算肺含水率 (%) = (湿质量 - 干质量) / 干质量 \times 100%。常规制作石蜡切片并苏木素-伊红 (HE) 染色。采用 Schmidt^[7] 及 Mayer 等^[8] 评分标准对胰、肺组织进行病理严重程度分析。

1.3 大鼠肺髓过氧化物酶 (MPO) 活性测定

称取一定量肺组织制备组织匀浆, 严格按照试剂盒 (南京建成生物试剂公司) 说明书操作。

1.4 大鼠肺组织肿瘤坏死因子 (TNF) - α 检测

采用免疫组织化学法, 兔抗大鼠单克隆抗体由 Cell Signaling Technology 公司提供。每只大鼠选 3 张结构完整的切片, 在 100 倍显微镜下观察, 用 Olympus DE70CCD 采集图像, 阳性标准: 肺泡上皮细胞和血管上皮细胞胞质出现棕黄色或核内有棕黄色颗粒。应用 Image-pro plus 6.0 免疫组织化学彩色图像分析系统对免疫组织化学结果进行定量分析, 以图片中的 1 个阳性点 (单个细胞或细胞团) 为基础, 分析测定整幅图片的阳性点个数、面积、积分吸光度值 (IA) 等参数。

1.5 Western blot 法检测大鼠肺组织中 PKB 和 p-PKB 的表达

取肺组织约 0.5 mg, 置于组织匀浆器中, 加入 1 mL 总蛋白提取液后冰浴下超声匀浆, 提取总蛋白, 采用内参照法行总蛋白定量。取 25 μ L/孔, 行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳 2 h, 然后转至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 加入兔抗鼠 PKB (1:400 稀释) 和兔抗鼠 p-PKB 单克隆抗体 (1:1000 稀释), 4 °C 过夜; 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:40 000 稀释); 增强化学发光 (ECL) 法显示结果, X 线片曝光显影, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参照。采用 Gelpro 4.0 版凝胶吸光度分析软件以及 Image-pro plus 6.0 软件分析结果, 以相应条带灰度值表示相对蛋白含量。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD- t 检验, 两组间比较采用成组 t 检验, 相关性检验采用线性相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺含水率、肺 MPO 活性

SAP 组各时间点肺含水率较 SO 组明显逐步升高 ($P <$

表 1 各组大鼠肺含水率、MPO 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 h		6 h		12 h	
	肺含水率 (%)	MPO 活性	肺含水率 (%)	MPO 活性	肺含水率 (%)	MPO 活性
SO 组	—	—	—	—	48.51 ± 2.21	1.29 ± 0.23
SAP 组	63.24 ± 1.32	3.79 ± 0.35	77.71 ± 2.31	8.54 ± 0.34	83.73 ± 2.36	13.24 ± 0.32
SAP + W 组	51.73 ± 1.77	2.53 ± 0.29	61.25 ± 2.79	5.39 ± 0.61	71.48 ± 2.58	8.73 ± 0.51
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 大鼠胰腺和肺病理学检查

SO 组胰腺组织镜下结构未见明显异常。SAP 各组胰腺组织出现不同程度出血、坏死、炎性细胞浸润，胰周组织脂肪坏死，且随造模时间延长逐渐加重；SAP + W 各组胰腺也出现不同程度损伤，较 SO 组严重，但与 SAP 组比较有所好转。SO 组大鼠肺组织镜下结构基本正常，SAP 组 3 h 镜下见肺间质开始充血、水肿，肺间质及肺小血管周围多量炎性细胞浸润。SAP 组 6、12 h 呈不同程度的肺泡和间质水肿、出血、灶性或片状肺不张，肺泡间隔进一步增宽，大量炎性细胞浸润，肺组织结构破坏等典型的 ALI 病理改变；SAP + W 组各时点肺损伤情况较 SAP 组各时点有明显好转，见表 2、图 1。

2.3 大鼠肺 TNF- α 染色面积和 IA 值

SO 组肺泡上皮细胞和血管内皮细胞表面均无明显染色，TNF- α 的表达为阴性。SAP 组术后 3 h 部分血管内皮

0.05)，肺 MPO 活性明显增强，呈逐步升高趋势 ($P <$ 0.05)，SAP 组 12 h 肺含水率、MPO 活性达到峰值。而 SAP + W 各组指标较 SO 组也明显升高 ($P <$ 0.05)，但与 SAP 各组比较明显下降 ($P <$ 0.05)，见表 1。

细胞表面有黄褐色颗粒出现，6 h 血管内皮细胞及肺泡上皮细胞表面均见黄褐色颗粒，12 h 肺组织血管内皮细胞表面有多量黄褐色或棕黄色颗粒，肺泡上皮细胞可见浓聚黄褐色颗粒。SAP + W 组肺组织 TNF- α 表达较 SAP 组有所下降。应用 IPP 免疫组织化学图像分析系统分析示，SAP 各组其阳性染色面积、A 值逐步升高，提示肺 TNF- α 的表达随 SAP 发病的推移逐步增强，与 SO 组比较差异有统计学意义 ($P <$ 0.05)，SAP + W 组较 SO 组增强 ($P <$ 0.05)，但较 SAP 组好转 ($P <$ 0.05)，见表 3、图 2。

2.4 大鼠肺 p-PKB 活性 Western blot 法检测

SO 组 PKB 磷酸化水平最低，SAP 组在造模后 PKB 磷酸化迅速升高，较 SO 组明显增加 ($P <$ 0.05)，SAP + W 组在给予药物抑制 PI3K/PKB 通路后，随发病时间推移 PKB 磷酸化水平逐步升高，与对照组比较仍较高 ($P <$ 0.05)，但较 SAP 组明显降低 ($P <$ 0.05)，见表 4、图 3。

表 2 大鼠胰、肺病理评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	胰腺组织学评分			肺组织学评分		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
SAP 组	7.68 ± 0.45	10.73 ± 0.29	12.58 ± 0.67	5.24 ± 0.32	5.73 ± 0.29	6.51 ± 0.26
SAP + W 组	5.64 ± 0.61	8.78 ± 0.58	9.75 ± 0.57	3.01 ± 0.42	4.03 ± 0.45	5.05 ± 0.33
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 3 各组大鼠肺 TNF- α 染色面积和 TNF- α IA 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 h		6 h		12 h	
	染色面积	IA 值	染色面积	IA 值	染色面积	IA 值
SO 组	—	—	—	—	148.51 ± 20.21	18.67 ± 5.28
SAP 组	363.23 ± 35.32	35.79 ± 8.35	770.71 ± 158.31	68.54 ± 9.34	1527.73 ± 322.36	153.24 ± 35.32
SAP + W 组	308.73 ± 40.77	26.53 ± 9.29	621.25 ± 167.79	50.39 ± 9.61	1171.48 ± 336.58	110.73 ± 36.51
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

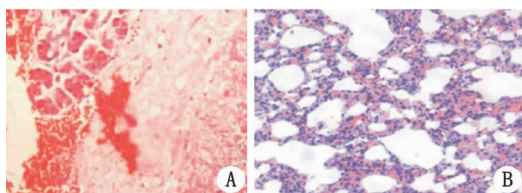


图 1 6 h 时 SAP 组大鼠胰腺组织 (A) 和肺组织 (B) 结构 (HE × 400)

表 4 Western blot 法检测各组大鼠肺 p-PKB 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h
SO 组	—	—	183.67 ± 41.48
SAP 组	390.28 ± 31.32	513.78 ± 31.67	598.36 ± 36.51
SAP + W 组	267.73 ± 37.56	361.28 ± 33.87	389.73 ± 42.38
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

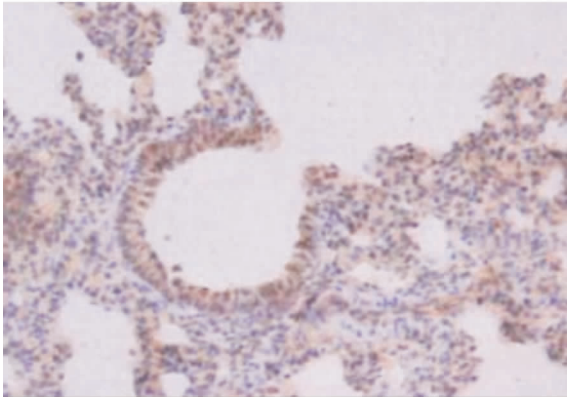
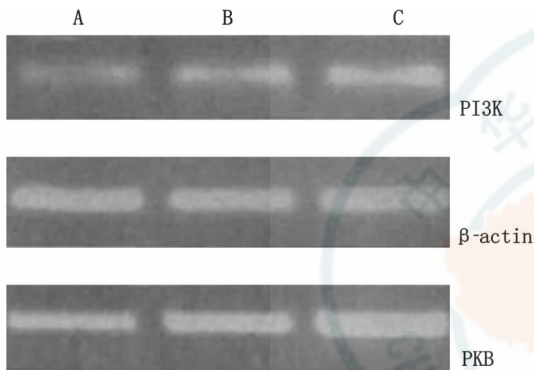


图 2 6 h 时 SAP 组肺组织 TNF- α 表达 (免疫组化 $\times 400$)



A: SO 组; B: SAP+W 组; C: SAP 组

图 3 各组肺组织 PI3K、PKB mRNA PCR 扩增产物电泳分离凝胶成像 (12 h)

3 讨论

ALI 是 SAP 最常见并发症, 当肺损伤发生时大量的炎性细胞迁移到肺部, 并释放大炎症介质, 对肺毛细血管上皮及肺泡上皮造成损害, 引起肺水肿及肺不张, 病情严重者会造成 ARDS^[9-10]。PI3K 存在于细胞中, 生物学作用广泛, 研究结果显示在炎症时它可以被多种炎性因子激活, 参与信号转导; 而 PKB 是位于 PI3K 下游的一种重要蛋白酶, 与 PI3K 关系密切。当 PI3K 被炎性因子激活后, 可以将 PtdIns (4, 5) P₂ 转变成第二信使 PtdIns (3, 4, 5) P₃ (也称 PIP₃), PIP₃ 可以和 PKB 的 PH 结构域结合, 使 PKB 磷酸化, 进一步引起细胞核内靶基因的变化, 从而调控中性粒细胞活化、迁移及炎性因子的表达, 故 PKB 的磷酸化可以作为衡量 PI3K 活性的指标^[11]。有研究结果显示, SAP 时肺组织中的 PI3K/PKB 活性增强, 与中性粒细胞的浸润及肺组织的损伤程度一致^[12]。说明该通路在介导中性粒细胞活化加重肺损伤的过程中起重要作用。本实验结果显示, 各组大鼠肺组织中 PKB 表达丰富, 但 PKB 磷酸化程度不一, SO 组大鼠肺组织中 PKB 的磷酸化程度低, SAP 各组大鼠肺组织中的 PKB 磷酸化程度明显增加, 且随时间推移逐渐升高, 12 h 达高峰。由此可见, SAP 时 PI3K 通路逐渐

被激活, 活化后的 PI3K 可促使 PKB 磷酸化加强, 进一步使 PKB 从细胞质转移到细胞膜并获得催化活性, 从而完成炎性因子介导的信号转导过程^[13]。同时, 与 SO 组比较, SAP 各组 MPO、TNF- α 的表达显著升高, 且与 PKB 的磷酸化水平在动态变化上保持一致。该结果提示 SAP 发生时, PI3K/PKB 通路被激活, 从而介导大量中性粒细胞活化, 肺组织中 MPO 活性明显升高, 提示大量中性粒细胞在肺组织中浸润, 加重炎症反应^[14]。

由肺含水率、肺组织病理改变, 可见随病程进展, 肺水肿、肺不张等肺损伤程度越重, 提示 PI3K/PKB 通路在 SAP-ALI 的发病中起重要作用。而在给予 PI3K 阻滞剂 Wortmannin 之后, PKB 的磷酸化水平 SAP+W 组较 SAP 组明显降低, 肺组织 MPO、TNF- α 变化也明显减低, 肺含水率及肺病理损伤也有所好转, 表明在 PI3K 被阻滞以后 PKB 的磷酸化受到抑制, 其活性降低, 从而减轻中性粒细胞的活化、迁移, 减轻肺水肿及肺不张的程度, 使肺损伤得到明显缓解, 进一步表明 Wortmannin 对肺组织起到一定的保护作用。

总之, PI3K/PKB 信号通路过度激活是 SAP 时肺损伤发生的重要步骤, 其激活后可以介导大量 PMN 向肺组织浸润并释放炎症介质, 加重肺损伤; 其作用可能是 SAP 并发急性肺损伤中重要的发病机制之一。而 Wortmannin 通过抑制 PI3K 通路活性来阻断细胞内信号的传导, 减轻炎症反应, 使肺组织得到保护。由于 ALI 的发病是一个多信号通路多炎性因子参与的由轻到重的连续过程, 若能进一步研究各个信号通路之间的交互关系, 早期安全有效地抑制这些通路活性将有利于控制 ALI 的进一步恶化, 这将对临床上治疗及控制胰腺炎肺损伤的发展有重要意义, 值得进一步探讨。

参考文献

- [1] Chen YP, Ning JW, Ji F. Establishment of the critical period of severe acute pancreatitis-associated lung injury [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8 (5): 535-540.
- [2] 武雅琴, 蒋峰, 黄建峰. 辛伐他汀通过 PI3K/Akt 通路缓解肺泡 II 型细胞缺氧复氧损伤 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28 (11): 1941-1943.
- [3] 闻庆平, 陈海龙, 关凤林. 大鼠重症急性胰腺炎时急性肺损伤的实验研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2003, 12 (10): 673-675.
- [4] 路小光, 战丽彬, 康新. 中性粒细胞弹性蛋白酶在重症胰腺炎急性肺损伤中的表达及大黄附子汤的干预作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27 (12): 1901-1904.
- [5] Procko E, McColl SR. Leukocytes on the move with phosphoinositide 3-kinase and its downstream effectors [J]. *Bioessays*, 2005, 27 (2): 153-163.
- [6] Singh VP, Saluja AK, Bhagat L, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute of pancreatitis [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108 (9): 1387-

1395.

- [7] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy [J]. *Ann Surg*, 1992, 215 (1): 44-56.
- [8] Mayer J, Ran B, Gansauge F. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications [J]. *Gut*, 2000, 47 (4): 546-552.
- [9] Pezzilli R, Bellacosa L, Felicani C. Lung injury in acute pancreatitis [J]. *JOP*, 2009, 10 (5): 481-484.
- [10] 龚平, 张璇, 宋政军. 阿魏酸钠对 L-精氨酸诱导的重症急性胰腺炎大鼠的作用 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2009, 18 (5): 504-507.
- [11] Lackner MR. Prospects for personalized medicine with inhibitors targeting the RAS and PI3K pathways [J]. *Expert Rev Mol*

Diagn, 2010, 10 (1): 75-87.

- [12] 鲍世韵, 伍天崇, 郭跃华. PI3K/PKB 信号转导通路在重症急性胰腺炎急性肺损伤中的活性变化 [J]. *中国急救医学*, 2010, 30 (1): 45-48.
- [13] Lee KS, Lee HK, Joel S. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model [J]. *FASEB J*, 2006, 20 (3): 455-465.
- [14] Keck T, Balcorn JH 4th, Ferrnandez-del Castillo C, et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122 (1): 188-201.

(收稿日期: 2014-06-21)

(本文编辑: 邵菊芳)

· 会议纪要 ·

中华医学会灾难医学分会第二届学术年会会议纪要

赵中辛 刘中民

2014 年 11 月 8 日至 9 日, 中华医学会灾难医学分会第二届学术年会在福州召开, 近 500 名来自中国大陆及海外的灾难医学专家、学者共聚一堂, 以“公立综合医院在应急救援中的地位和作用”为主题, 研讨了近几年来在灾难医学救援及相关领域的热点问题, 总结交流展示了各自的经验和新成果, 为灾难医学分会今后的工作提供了宝贵资料和经验, 进一步推动了我国灾难医学事业发展。

本次年会正值灾难医学分会成立三周年和换届。三年来, 在中华医学会的正确领导下, 在分会各位常委、委员的积极参与和大力支持之下, 分会团结全国从事灾难医学“医、教、研”工作的广大医护及管理人员, 开展了一系列的学术及科普工作, 取得了丰硕的成果。在“民主办会”、“组织建设”、“学术交流”、“科普教育”、“临床救灾”、“基础理论研究”、“国际交往”诸多方面取得长足的进步。

本次会议也是灾难医学分会的第二次年会, 我分会主任委员、同济大学附属东方医院刘中民教授作了“公立医院在灾难应急救援中的作用和地位”的主题演讲。他着重介绍了东方医院在“应急与灾难医学学科”建设中的做法和经验, 指出“公立医院以其强大的专业医疗技术优势和物质资源, 必然成为灾难应急医疗救援的中坚力量”。来自我国地方三级医院的贾农、余成敏、刘励军代表分别就“昆明火车站 3·01 暴恐事件救援”、“云南鲁甸地震救援”、“昆山 8·02 爆炸事件应急救援”作了发言介绍。他们的经验和有效措施, 进一步验证各级公立医院在应急医学救援中的主导地位 and 关键作用, 对与会代表是很好的启发。分会名誉主委王一镗教授在开幕式上发表讲话, 他回顾了分会成立 3 年的历程, 充分肯定分会三年来的工作。王老的谆谆教导和鼓励对与会代表是极大的鼓舞和鞭策。天津武警后勤学院附属医院

候世科教授就“应急救援医疗装备的现状与发展”作了演讲, 强调医疗救援装备的研发是实施科学有效医学救援的保证。北京武警总医院王立祥教授就“建立腹部心肺复苏学”做了演讲, 王教授主持研发的“腹部心肺复苏系列技术”, 开辟了心肺复苏方法研究应用的新领域。重庆第三军医大学张连阳教授就“美军机动外科医疗队启示”作了演讲介绍, 美军机动外科医疗队“模块化、小型化、机动性、灵活性”的建设经验, 值得我国灾难应急救援队借鉴。美国创伤外科学会主席 Scalea 教授向大会发来贺信并作了“美国灾难现场创伤救治经验与技术”的视频发言。专家们的精彩演讲使与会代表受益匪浅。分会常委著名媒体人央视主播白岩松就灾难医学提出了自己的见解: “灾难医学会还应该增加些元素, 要避免对医生的伤害以免其成为新的灾难, 作为临床‘一线中的一线’的急救医护人员总是处在风口浪尖上, 我们需要有随时面对的心态”。此外, 大会还就一些热点问题进行了学术交流。南京军区总医院孙海晨教授就“灾难医学的概念和特点”作了发言。第二军医大学曹广文教授作了“人群和医院脆弱性评价在灾难预防和救援中的作用”的发言, 指出重视“脆弱性评估”对防灾备灾救灾有重要意义。以上灾难医学基础理论的研究成果, 将对灾难医学学科的发展起到指导作用。汪茜、彭碧波、史宇等武警总医院灾害救援研究所的多名专家对地震现场心理干预方法进行了探讨研究, 并分享了他们的研究成果。

本次年会共收到论文 300 余篇, 其中 30 篇在大会进行了现场交流。在全体参会代表的共同努力下, 年会取得了圆满成功。

(收稿日期: 2014-12-20)

(本文编辑: 郑辛甜)